

А. В. Анюшин, М. Р. Кабилов, Д. В. Пышный

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
просп. Академика Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия
E-mail: kabilov@niboch.nsc.ru

ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЕЛЕКТИВНОСТИ ГИБРИДАЦИИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗОНДОВ МЕТОДОМ ТЕРМИЧЕСКОЙ ДЕНАТУРАЦИИ*

Продемонстрирована применимость флуорометрического подхода к параллельному анализу физико-химических характеристик комплексообразования олигонуклеотидов с ДНК. Проведено исследование способности модифицированных олигонуклеотидных зондов, несущих LNA-звено (Locked Nucleic Acids), дискриминировать одиночный мисматч в составе дуплекса с ДНК-матрицей. С использованием стандартного амплификатора с функцией детекции сигнала в режиме реального времени определены термодинамические параметры формирования совершенных и несовершенных комплексов ДНК, образованных нативными зондами и их модифицированными аналогами. Рассчитаны величины предельной селективности гибридизации зондов при дискриминации пурин/пуринового мисматча А/А. Доказано, что LNA-содержащие зонды, по сравнению с нативными, обладают повышенной селективностью гибридизации (от 1,4 до 5,9 раза при 65 °С). Наибольшей способностью дискриминировать однонуклеотидное несоответствие обладают модифицированные зонды, LNA-звено в составе которых при формировании дуплекса располагается непосредственно напротив нуклеотидной замены в анализируемой ДНК.

Ключевые слова: олигонуклеотиды, мисматч, LNA, селективность гибридизации, флуорометрический анализ, термодинамика комплексообразования.

Разработка подходов к быстрому анализу наличия точечных мутаций в ДНК является одной из основных задач биоорганической химии и молекулярной биологии, направленных на совершенствование методов клинической диагностики. Проблема выявления локальных изменений в последовательности ДНК чрезвычайно актуальна, поскольку вариации структуры генома являются причинами наследственных и онкологических заболеваний, определяют патогенность и/или лекарственную устойчивость возбудителей различных социально значимых болезней, таких как СПИД, гепатиты, туберкулез и др. [1; 2].

В настоящее время используются различные подходы к детекции точечных мутаций в ДНК, ряд из которых основан на принципах аллель-специфичной гибридизации (АСГ) [3]. Она базируется на различиях в эффективности комплексообразования олигонуклеотидного зонда с анализируемой ДНК в отсутствие и при наличии мутации.

При этом образуются либо комплементарные дуплексы, либо дуплексы, содержащие некомплементарные пары оснований (мисматчи) соответственно. Как правило, наличие в двухцепочечной структуре ДНК-дуплекса мисматча приводит к его дестабилизации. Снижение термической стабильности двойной спирали в значительной степени зависит от типа мисматча и композиции совершенных пар оснований, фланкирующих его в комплексе [4]. Одной из основных проблем, возникающих при разработке диагностикомов на основе АСГ, является то, что в случае реализации ряда мисматчей снижение стабильности комплексов нативных олигодезоксирибонуклеотидных зондов с ДНК оказывается недостаточным для достоверного выявления нуклеотидной замены в анализируемой цепи биополимера. К числу трудно выявляемых относятся мисматчи, например, G/T или G/A в некоторых нуклеотидных контекстах.

* Работа выполнена при финансовой поддержке программ Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов», СО РАН (междисциплинарные гранты № 76, 39 и 9), государственных контрактов (02.512.11.2200-26, 02.513.12.3010, ИИХ-3689.2008.4).

Для повышения эффективности дискриминации несовершенных дуплексов проводится поиск различных аналогов и производных олигонуклеотидов, селективность гибридизации которых, т. е. эффективность дискриминации несовершенных комплексов, выше, чем у их нативных предшественников [5; 6]. Однако детальной характеристике селективности модифицированного зонда в большинстве случаев не производится, поскольку это требует углубленного термодинамического анализа, выходящего за рамки поисковых исследований. Эффективность дискриминации мисматчей должна быть охарактеризована на уровне сопоставления термодинамических параметров (энтальпии, энтропии и свободной энергии Гиббса) образования совершенного и мисматч-содержащего комплексов. Именно эти величины определяют эффективность формирования (степень ассоциации) дуплексов, формируемых олигонуклеотидным зондом в заданных условиях [4; 7].

Наиболее часто определение термодинамических параметров комплексообразования, позволяющих строго охарактеризовать селективность зонда, производят методом термической денатурации олигонуклеотидных комплексов с регистрацией поглощения света в области 260–280 нм [7]. В последнее время наблюдается тенденция ко все более широкому привлечению современных флуорометрических подходов к анализу физико-химических характеристик комплексообразования олигонуклеотидов с ДНК [8]. Данная ситуация связана с распространением техники «ПЦР в реальном времени» для проведения ДНК-анализов, однако потенциал данного оборудования для целей физико-химической биологии реализован недостаточно.

Целью исследования являлось установление применимости флуорометрического подхода к параллельному анализу физико-химических характеристик комплексообразования олигонуклеотидов. Использование современного ДНК-амплификатора с флуорометрическим детектором обеспечивает возможность исследования термической стабильности большого набора образцов (до 96), различающихся структурой анализируемых дуплексов и / или составом среды, в которой протекает комплексообразование.

Именно такие систематические данные требуются в настоящее время при скрининговых исследованиях комплексообразующих свойств новых олигонуклеотидных производных и их аналогов или при определении унифицированных термодинамических параметров формирования элементов НК-дуплексов.

Материал и методы

Нативные олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы фосфитамидным методом на ДНК-синтезаторе ASM-800 («Биосет», Россия) с использованием коммерчески доступных синтонов и твердофазного носителя («Glen Research», США). После проведения стандартной процедуры деблокирования олигонуклеотиды выделяли с помощью обращено-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1200 («Agilent Technologies», США) с использованием колонки Eclipse XDB-C18-5 (4,6 × 150 мм) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила от 0 до 30 % за 30 мин в 100 мМ триэтиламмоний ацетатном буфере (рН 7,0). Скорость потока элюента была 2 мл/мин.

В работе использованы производные олигонуклеотидов, несущие остатки флуоресцина на 5'-конце и тушителя флуоресценции ВНQ1 на 3'-конце цепи (лаборатория медицинской химии ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) и LNA-содержащие олигонуклеотиды («ДНК-синтез», Россия). Гомогенность всех использованных в исследовании олигонуклеотидов подтверждали по данным гель-электрофоретического анализа в денатурирующем полиакриламидном геле (8 М мочевины, 20 % ПААГ, 90 мМ трис-борат, рН 8,3).

Концентрацию олигонуклеотидов определяли на спектрофотометре UV-2100 («Shimadzu», Япония), используя величины молярных коэффициентов поглощения (ϵ_{260}) моно- и динуклеотидов, а также остатков модифицирующих красителей, при длине волны 260 нм.

Термическую денатурацию олигонуклеотидных комплексов с регистрацией оптического сигнала ($\lambda = 260$ и 280 нм) проводили в буфере, содержащем 1 М NaCl, 10 мМ какодилат натрия (рН 7,0), 0,1 мМ Na₂EDTA. Суммарную концентрацию взаимодейст-

вующих олигонуклеотидных компонентов, взятых в стехиометрическом соотношении, варьировали в диапазоне 2×10^{-6} – 10^{-5} М, исследуя термостабильность комплексов на спектрофотометрической установке Cary 300 BioMelt («Varian», Австралия) при скорости нагрева образцов $0,5$ °С/мин. Термическую денатурацию олигонуклеотидных комплексов с флуориметрической регистрацией сигнала ($\lambda_{\text{Ex}} = 485$ нм и $\lambda_{\text{Em}} = 530$ нм) проводили в буферных условиях, указанных выше, используя ДНК-амплификатор IQ5 («Bio-Rad», США). Диапазон суммарных концентраций олигонуклеотидных компонентов в этом случае варьировали в интервале 2×10^{-8} – 2×10^{-6} М. Скорость нагрева образцов составляла $1,0$ °С/мин. Температуру образцов изменяли в диапазоне от 5 до 95 °С.

Термодинамические параметры формирования комплексов (энтальпию, ΔH°) и энтропию, ΔS°) определяли из анализа профиля кривых термической денатурации (плавления) в рамках модели двух состояний с наклонными базовыми линиями [7] с учетом термического расширения воды, используя программу «Simplex» (А. В. Иванов, ИЛФ СО РАН). Результирующие термодинамические параметры являлись усреднением соответствующих величин, полученных при анализе минимум двух или трех кривых плавлений, зарегистрированных соответственно спектрофотометрически и флуориметрически. За температуру плавления ($T_{\text{пл}}$) комплексов принимали температуру, при которой степень их ассоциации равнялась $0,5$, и рассчитывали на основании полученных величин энтальпии и энтропии формирования двойной спирали по формуле:

$$T_{\text{пл}} = \frac{\Delta H^\circ}{\Delta S^\circ + 1,987 \times \ln\left(\frac{C_T}{4}\right)} - 273,15,$$

где C_T – суммарная концентрация олигонуклеотидов; $T_{\text{пл}}$ – температура плавления дуплекса, ΔH° и ΔS° – энтальпия и энтропия комплексообразования олигонуклеотидов.

Результаты исследования и обсуждение

В настоящее время термодинамические характеристики комплексообразования оли-

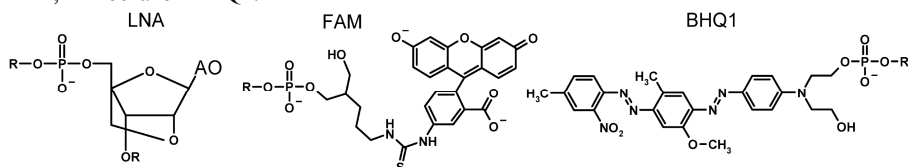
гонуклеотидов с нуклеиновыми кислотами в основном определяют методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. Метод удобен, прост и позволяет проводить анализ, как правило, не более десятка образцов в день на единицу специализированного спектрофотометрического оборудования. В процессе анализа образца производится регистрация величины оптической плотности растворов, содержащих взаимодействующие нуклеотидные компоненты, в зависимости от температуры. В связанном состоянии, в составе как внутри-, так и межмолекулярных комплексов, нуклеиновые кислоты (НК) характеризуются меньшим коэффициентом молярного поглощения света в диапазоне длин волн 230 – 280 нм. Следовательно комплексообразование НК сопряжено с реализацией так называемого гипохромного эффекта. На основании анализа профиля кривых плавления (денатурации / ренатурации) определяют величины энтальпии и энтропии формирования комплексов. С развитием метода «ПЦР в реальном времени» появилось оборудование, обеспечивающее высокоточную детекцию флуоресцентного сигнала и контроль температуры анализируемого образца. При наличии строгой зависимости интенсивности флуоресценции образцов, содержащих взаимодействующие НК-компоненты, от температуры появляется возможность определять термодинамические характеристики перехода из свободного в связанное состояние.

В рамках известных флуориметрических методов анализа комплексообразования НК наиболее эффективными являются подходы, использующие принцип резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). «Молекулярные маяки» (molecular beacons) являются наиболее удобными зондами в рамках флуориметрических подходов. Внутримолекулярное сближение донора и неизлучающего акцептора флуоресценции (тушителя) обеспечивает возможность наиболее демонстративного способа визуализации перехода олигонуклеотидной цепи из одного состояния в другое. Однако зонды, не формирующие внутримолекулярные шпильчатые структуры, более предпочтительны, поскольку по изменению их флуоресценции можно наблюдать преимущественно процесс межмолекулярного комплексо-

Структуры нативных и LNA-содержащих комплексов, несущих остатки красителей (FAM и BHQ1). Температуры плавления и термодинамические параметры формирования дуплексных структур

	Структура комплекса	ΔH° , ккал/моль	ΔS° , ккал \times моль ⁻¹ \times К ⁻¹	ΔG°_{65} , ккал/моль	$T_{пл}$, °С*
N1 / z1	X - ^{5'} GTGAACGCCTATCTG ^{3'} - Y ^{3'} CACTTGC $\overline{\text{GGAT}}$ AGAC ^{5'}	-123,9 \pm 10,6 -105,4 \pm 2,2 [#]	-334,0 \pm 31,1 -281,0 \pm 6,5 [#]	-10,9 \pm 0,1 -10,4 \pm 0,0 [#]	67,0 65,5 [#]
M1 / z1	X - ^{5'} GTGAACGCCAATCTG ^{3'} - Y ^{3'} CACTTGC $\overline{\text{GGAT}}$ AGAC ^{5'}	-81,1 \pm 4,8 -90,5 \pm 1,7 [#]	-213,3 \pm 14,3 -242,9 \pm 5,2 [#]	-8,9 \pm 0,1 -8,4 \pm 0,1 [#]	59,9 58,5 [#]
N1 / z1[A _L]	X - ^{5'} GTGAACGCCTATCTG ^{3'} - Y ^{3'} CACTTGC $\overline{\text{GGAL}}$ TAGAC ^{5'}	-100,2 \pm 2,9 -103,1 \pm 4,5 [#]	-264,4 \pm 8,7 -271,2 \pm 13,2 [#]	-10,8 \pm 0,1 -11,4 \pm 0,1 [#]	67,0 69,0 [#]
M1 / z1[A _L]	X - ^{5'} GTGAACGCCAATCTG ^{3'} - Y ^{3'} CACTTGC $\overline{\text{GGAL}}$ TAGAC ^{5'}	-93,0 \pm 4,3 -90,5 \pm 2,3 [#]	-250,1 \pm 13 -241,7 \pm 7,1 [#]	-8,5 \pm 0,1 -8,7 \pm 0,1 [#]	58,6 59,6 [#]
N1 / z1[G _L]	X - ^{5'} GTGAACGCCTATCTG ^{3'} - Y ^{3'} CACTTGC $\overline{\text{GLGAT}}$ AGAC ^{5'}	-109,9 \pm 11 -102,4 \pm 2,3 [#]	-293,1 \pm 32,3 -269,7 \pm 7,0 [#]	-10,4 \pm 0,1 -11,2 \pm 0,1 [#]	66,8 68,2 [#]
M1 / z1[G _L]	X - ^{5'} GTGAACGCCAATCTG ^{3'} - Y ^{3'} CACTTGC $\overline{\text{GLGAT}}$ AGAC ^{5'}	-107,7 \pm 12,4 -86,7 \pm 2,0 [#]	-293,4 \pm 37,2 -229,9 \pm 6,1 [#]	-8,5 \pm 0,2 -9,0 \pm 0,0 [#]	59,7 60,4 [#]
N2 / z2	X - ^{5'} TGAACGCCCTATCTG ^{3'} - Y ^{3'} ACTTGC $\overline{\text{GGGAT}}$ AGAC ^{5'}	-127,9 \pm 10,6	-343,4 \pm 31,1	-11,8 \pm 0,1	69,0
M2 / z2	X - ^{5'} TGAACGCCCAATCTG ^{3'} - Y ^{3'} ACTTGC $\overline{\text{GGGAT}}$ AGAC ^{5'}	-83,2 \pm 3,7	-218,1 \pm 10,9	-9,5 \pm 0,1	61,9
N2 / z2[A _L]	X - ^{5'} TGAACGCCCTATCTG ^{3'} - Y ^{3'} ACTTGC $\overline{\text{GGGAL}}$ TAGAC ^{5'}	-107 \pm 10,0	-283,2 \pm 29,3	-11,3 \pm 0,1	68,0
M2 / z2[A _L]	X - ^{5'} TGAACGCCCAATCTG ^{3'} - Y ^{3'} ACTTGC $\overline{\text{GGGAL}}$ TAGAC ^{5'}	-105,8 \pm 11,6	-285,6 \pm 34,7	-9,2 \pm 0,1	61,9
N2 / z2[G _L]	X - ^{5'} TGAACGCCTATCTG ^{3'} - Y ^{3'} ACTTGC $\overline{\text{GLGGAT}}$ AGAC ^{5'}	-126,7 \pm 9,1	-340,4 \pm 26,3	-11,6 \pm 0,2	68,7
M2 / z2[G _L]	X - ^{5'} TGAACGCCAATCTG ^{3'} - Y ^{3'} ACTTGC $\overline{\text{GLGGAT}}$ AGAC ^{5'}	-93 \pm 8,7	-246,8 \pm 25,6	-9,5 \pm 0,0	62,6
N3 / z3	X - ^{5'} GAACGCCACTATCTG ^{3'} - Y ^{3'} CTTGC $\overline{\text{GGTGA}}$ ATAGAC ^{5'}	-121,2 \pm 8,5	-323,9 \pm 24,7	-11,7 \pm 0,1	69,1
M3 / z3	X - ^{5'} GAACGCCCAATCTG ^{3'} - Y ^{3'} CTTGC $\overline{\text{GGTGA}}$ ATAGAC ^{5'}	-81,9 \pm 5,7	-215,2 \pm 16,9	-9,2 \pm 0,1	60,6
N3 z3[A _L]	X - ^{5'} GAACGCCACTATCTG ^{3'} - Y ^{3'} CTTGC $\overline{\text{GGTGAAL}}$ TAGAC ^{5'}	-114,9 \pm 9,5	-305,5 \pm 27,6	-11,6 \pm 0,2	69,1
M3 / z3[A _L]	X - ^{5'} GAACGCCCAATCTG ^{3'} - Y ^{3'} CTTGC $\overline{\text{GGTGAAL}}$ TAGAC ^{5'}	-85,8 \pm 3,4	-227,5 \pm 10,1	-8,9 \pm 0,1	59,8
N3 / z3[G _L]	X - ^{5'} GAACGCCACTATCTG ^{3'} - Y ^{3'} CTTGC $\overline{\text{GLGTGA}}$ ATAGAC ^{5'}	-129,7 \pm 8,1	-348,2 \pm 23,6	-11,9 \pm 0,2	69,6
M3 / z3[G _L]	X - ^{5'} GAACGCCCAATCTG ^{3'} - Y ^{3'} CTTGC $\overline{\text{GLGTGA}}$ ATAGAC ^{5'}	-91,2 \pm 6,1	-243,4 \pm 18,3	-8,9 \pm 0,2	60,2

Примечание: * – температуры плавления были рассчитаны для суммарной концентрации олигонуклеотидов 2 мкМ, A_L и G_L – LNA-нуклеотиды, # – параметры, полученные с помощью спектрофотометрического подхода, X – остаток FAM, Y – остаток BHQ1.



где R – олигонуклеотидная цепь, АО – азотистое основание (А или G).

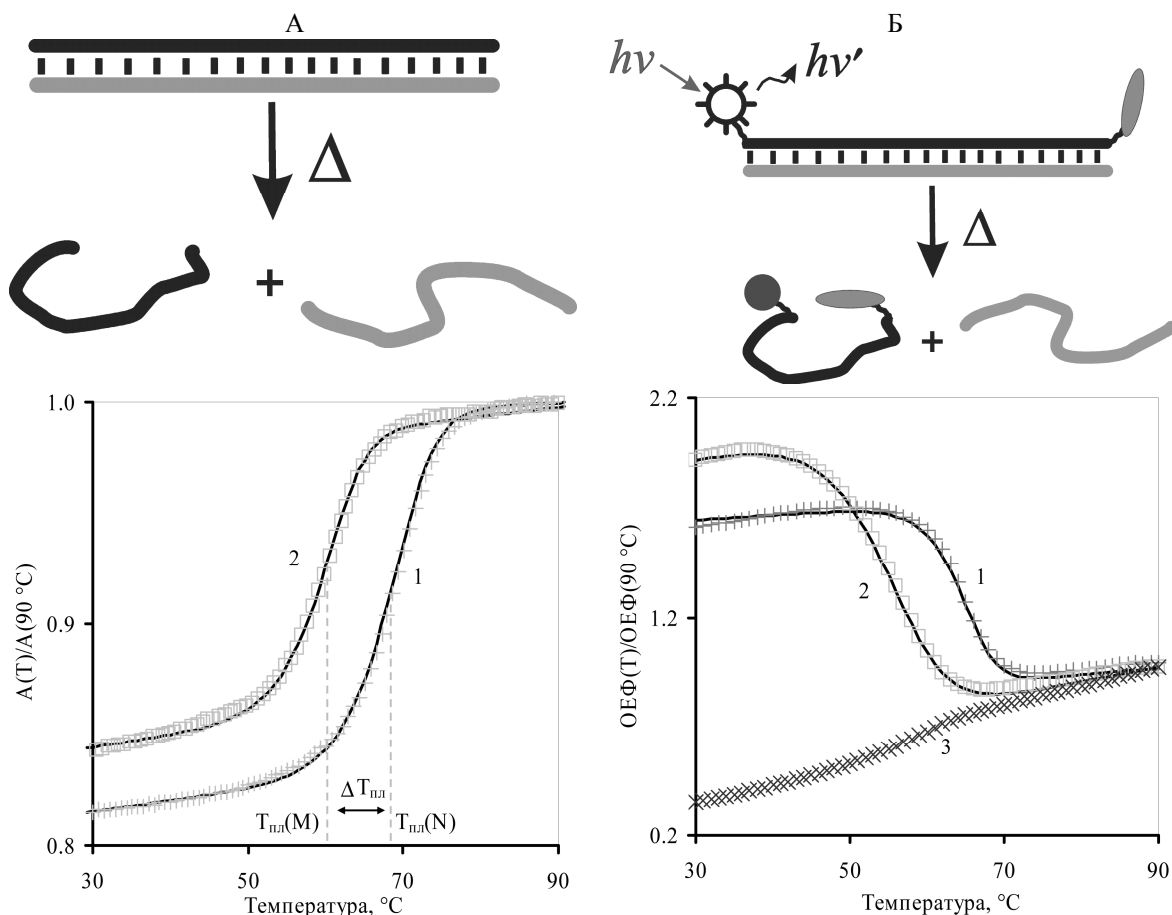


Рис. 1. Схема процессов, сопряженных с термической денатурацией ДНК-комплексов, при регистрации оптического (А) и флуоресцентного (В) сигналов (сверху) и типичные нормированные кривые плавления дуплексов (внизу).

Кривые плавления совершенного N1 / Z1 (кривая 1) и несовершенного M1 / Z1 (кривая 2) дуплексов. Температурная зависимость относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) меченого олигонуклеотида N1 (кривая 3)

образования. На основании этого нами был проведен дизайн модельных систем и синтезированы соответствующие компоненты (табл.), которые удовлетворяли ряду критериев. Во-первых, олигонуклеотиды не содержали в последовательности самокомплементарных участков, достаточных для формирования шпильчатой структуры. Во-вторых, их GC-состав был близок к 50 %. В-третьих, в последовательностях отсутствовали протяженные (более 3 нуклеотидов) гомопуриновые и / или гомопиримидиновые повторы. И, в-четвертых, ближайшее нуклеотидное окружение сайта мутации и / или модификации оставляли неизменными.

Модельные пентадекануклеотидные комплексы формировали, используя ДНК-матрицы, несущие на концах остатки флуоресцеина (5'-Flu) и 3'-ВНQ1, и нативные олигодезоксирибонуклеотиды и их произ-

водные. При этом образовывались совершенные (полностью комплементарные) и несовершенные дуплексы с одним мисматчем. Формирование комплекса обеспечивало перевод свободной матричной цепи из «клубкообразного» состояния, предполагающего пространственно сближенные флуорофор и тушитель, в жесткое двухцепочечное с разнесенными красителями. В данном случае кривые термической денатурации с флуориметрической детекцией должны отражать переход из дуплекса с высоким уровнем флуоресценции в одноцепочечное «потушенное» состояние.

Типичные данные, характеризующие экспериментальные кривые плавления, представлены на рис. 1. Видно, что в соответствии с дизайном модельной системы наблюдается адекватная температурная зависимость флуоресценции образцов, содер-

жащих как совершенный, так и несовершенный комплексы (см. рис. 1, Б). Повышение температуры в диапазоне 25–95 °С приводит к денатурации дуплексов. Уровень флуоресценции при этом снижается примерно в 2 раза (при концентрации 10^{-7} М). В то же время, например, при 30 °С, наблюдается сильное отличие в уровнях флуоресценции (4,5–7 раз) для меченой ДНК-матрицы в одно- и двуцепочечном состоянии. При нагревании эффективность флуоресценции ДНК-матрицы в свободном состоянии характеризуется плавным возрастанием, без кооперативных переходов, отражая лишь разнесение флуорофора и тушителя при разупорядочивании цепи олигонуклеотида. Аналогичным образом, близким к линейной зависимости, изменяются и базовые линии на кривых плавления дуплексных структур (низко- и высокотемпературные участки). Этот факт дает возможность описания профилей кривых денатурации в рамках модели двух состояний для определения соответствующих величин термодинамических параметров комплексообразования.

Сопоставление флуорометрических кривых плавления и стандартных кривых, зарегистрированных спектрофотометрически (см. рис. 1, А), дополнительно указывает на то, что данные, полученные с использованием ДНК-амплификатора, отражают именно денатурацию комплексов ДНК. Анализ профилей соответствующих кривых плавления, полученных в рамках обоих методов регистрации, дает близкие величины как термодинамических параметров комплексообразования, так и температур плавления для ряда модельных комплексов (см. табл.: комплексы 1–6). В среднем различие величин энтальпии (ΔH°) и свободной энергии комплексообразования (ΔG_{65}°), определенных двумя подходами, составляет 6 и 2 % соответственно, а среднее отклонение температур плавления ($T_{пл}$) – 1,3 °С. Важно отметить, что величины ошибок определения энергетических параметров каждым из использованных методов регистрации сигнала гибридизации также близки, что свидетельствует о хорошей воспроизводимости получаемых данных.

Анализ влияния модификаций на селективность олигонуклеотидного зонда имеет

смысл лишь при непосредственном сравнении нативного и модифицированного зондов. В нашем случае немодифицированные зонды сопоставлялись с олигонуклеотидами, содержащими LNA, которые считаются более селективными и широко используются в ДНК-диагностике [9; 10]. Применяя флуорометрический подход, были определены термодинамические параметры комплексообразования (ΔH° и ΔS°) всех модельных дуплексов как полностью комплементарных, нативных и LNA-содержащих, так и соответствующих несовершенных (см. табл.). На основании этих энергетических характеристик рассчитывали значения свободной энергии образования дуплексных структур и их температуры плавления. Из полученных данных видно, что во всех случаях температура плавления комплексов ДНК при введении в них модифицированного LNA-звена возрастает, в среднем на 2,1 °С. Причем средний стабилизирующий эффект от введения РНК-подобного нуклеотида в состав совершенных комплексов (+2,5 °С) оказывается несколько выше, чем при модификации несовершенных (+1,7 °С). Наличие в комплексах мисматча, в отличие от LNA-вставки, во всех случаях вызывает значительную дестабилизацию спирали ДНК, в среднем на 7,6 °С (рис. 2, А).

В результате простого анализа термостабильности совершенных и несовершенных комплексов получены данные, которые могут указывать на то, что введение LNA-звена, возмущающего регулярную структуру спирали ДНК, характеризуется повышением селективности комплексообразования олигонуклеотидов с ДНК. Однако по варьированию $\Delta T_{пл}$, с одной стороны, невозможно судить о количественных изменениях предельной селективности, а с другой – проведенный теоретический анализ [11] и полученные ранее экспериментальные данные (не приведены) показали, что существуют прецеденты роста $\Delta T_{пл}$ с одновременным падением селективности. Поэтому на основании столь упрощенного рассмотрения невозможно оценивать реальные отличия в эффективности дискриминации несоответствий при комплексообразовании нативных и модифицированных олигонуклеотидов со специфическими НК. Истинную селективность комплексообразования того или иного зонда с ДНК можно охарактеризовать

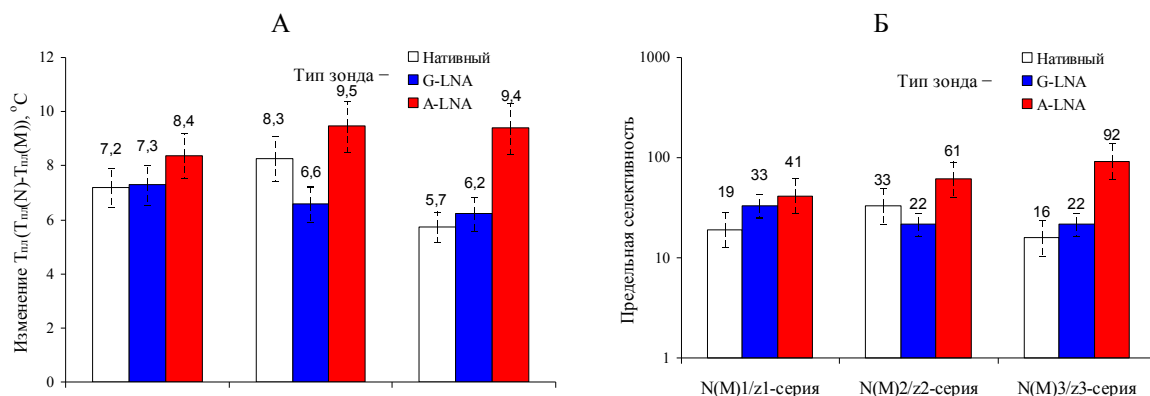


Рис. 2. Параметры, характеризующие селективность гибридизации нативных и модифицированных LNA-содержащих зондов при выявлении мисматча A/A: изменения температуры плавления $\Delta T_{пл}$ при переходе от совершенного к несовершенному комплексу зонд-ДНК (А); предельная селективность гибридизации при 65 °С (Б).

A-LNA – зонды, содержащие LNA-звено непосредственно напротив полиморфного сайта ДНК-матрицы; G-LNA – зонды, содержащие LNA-звено, удаленное от полиморфного сайта на 1, 2 и 3 пары оснований.

функцией предельной селективности f_{α}^{lim} . Данная функция представляющая собой отношение равновесных констант ассоциации совершенного (N) и несовершенного (M) комплексов, формируемых олигонуклеотидом в определенных условиях:

$$f_{\alpha}^{\text{lim}}(T) = \frac{K_N}{K_M} = \frac{\exp[-(\Delta H_N^{\circ} - T\Delta S_N^{\circ})/RT]}{\exp[-(\Delta H_M^{\circ} - T\Delta S_M^{\circ})/RT]} = \exp[-(\Delta G_N^{\circ} - \Delta G_M^{\circ})/RT] = \exp[-\Delta\Delta G^{\circ}/RT],$$

где R – универсальная газовая постоянная, равная $1,987 \text{ кал} \times \text{моль}^{-1} \times \text{K}^{-1}$; T – выбранная для анализа температура, равная 65 °С (338,15 °K).

Значение f_{α}^{lim} при заданном значении температуры показывает, какой максимальной величины может достигать отношение степеней ассоциации, или же истинных величин гибридизационных сигналов, при комплексобразовании зонда с полностью комплементарной ДНК и ДНК, содержащей тот или иной мисматч.

Располагая величинами термодинамических параметров комплексобразования олигонуклеотидных зондов (см. табл.), рассчитывали значения предельной селективности гибридизации нативных и модифицированных, LNA-содержащих зондов. Полученные результаты показывают, что в большинстве случаев введение в последова-

тельность зонда всего одного LNA-звена вызывает повышение (от 1,4 до 5,9 раза) достижимого уровня селективности, а следовательно, и точности дискриминации несовершенных комплексов при 65 °С (рис. 2, Б). Во всех трех модельных системах наличие LNA-звена в позиции мисматча, т. е. непосредственно напротив нуклеотидной замены в распознаваемом ДНК-фрагменте, вызывает максимальное повышение предельной селективности гибридизации до значений 41–92. По-видимому, введение модифицированного нуклеотида, имеющего жесткую РНК-подобную конформацию (В- и А-формы НК-спиралей значительно различаются), вызывает возмущение регулярной структуры ДНК-дуплекса. Наличие такого LNA нуклеотида может вызывать локальные напряжения в двойной В-спирали, что должно воспрепятствовать выгодной укладке неспаренных оснований мисматча A/A.

Заключение

Проведенные исследования убедительно показывают, что получившие широкое применение зонды на основе LNA-содержащих олигонуклеотидов действительно обладают повышенной селективностью распознавания специфических последовательностей ДНК. Полученные доказательства впервые основываются на строгом анализе термодинамических характеристик, отражающих не просто изменение стабильности дуплексов

($\Delta T_{пл}$), а предельно достижимый уровень отношения степеней комплексообразования зонда с полностью комплементарной ДНК и ДНК, содержащей однонуклеотидную замену. Кроме того, в данной работе представлены данные, свидетельствующие о том, что амплификаторы с блоком регистрации флуоресценции в реальном времени являются перспективными для проведения объемных физико-химических исследований, направленных на оптимизацию систем гибридизационного анализа НК, и, как следствие, на повышение точности создаваемых ДНК-диагностикумов.

Список литературы

1. *Hirschhorn J. N., Daly M. J.* Genome-wide association studies for common diseases and complex traits // *Nat. Rev. Genet.* 2005. Vol. 6. P. 95–108.
2. *Robert J., Morvan V. L., Smith D., Pourquier P., Bonnet J.* Predicting drug response and toxicity based on gene polymorphisms // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2005. Vol. 54, № 3. P. 171–196.
3. *Kim S., Misra A.* SNP genotyping: technologies and biomedical applications // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2007. Vol. 9. P. 289–320.
4. *SantaLucia J. Jr., Hicks D.* The thermodynamics of DNA structural motifs // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2004. Vol. 33. P. 415–440.
5. *Shantanu K., Deepak B.* Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. Vol. 71. P. 575–586.
6. *Gallo M., Montserrat J. M., Iribarren A. M.* Design and applications of modified oligonucleotides // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2003. Vol. 36. P. 143–151.
7. *Petersheim M., Turner D. H.* Base-stacking and base-pairing contributions to helix stability: thermodynamics of double-helix formation with CCGG, CCGGp, CCGGAp, ACCGGp, CCGGUp, and ACCGGUp // *Biochemistry.* 1983. Vol. 22. P. 256–263.
8. *Ahsen N. von, Wittwer C. T., Schütz E.* Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for Mg^{2+} , deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas // *Clin. Chem.* 2001. Vol. 47, № 11. P. 1956–1961.
9. *You Y., Moreira B. G., Behlke M. A., Owczarzy R.* Design of LNA probes that improve mismatch discrimination // *Nucleic Acids Research.* 2006. Vol. 34. P. E60–E61.
10. *Ugozzoli L. A., Latorra D., Puckett R., Arar K., Hamby K.* Real-time genotyping with oligonucleotide probes containing locked nucleic acids // *Anal. Biochem.* 2004. Vol. 324. P. 143–152.
11. *Кабиров М. П.* Выявление точечных мутаций в ДНК методом лигирования олигонуклеотидов: селективность этапов гибридизации и лигирования: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2007.

Материал поступил в редколлегию 18.06.2009

A. V. Anyushin, M. R. Kabilov, D. V. Pyshnyj

Fluorometric Analysis of Selectivity of Oligonucleotide Probes Hybridization by The Thermal Denaturation Method

The fluorometric approach was shown to be applied to the parallel analysis of physico-chemical characteristics of the complex formation between oligonucleotides and DNA. We have studied an opportunity of modified oligonucleotide probes containing the LNA unit (Locked Nucleic Acid) to discriminate a single mismatch in duplexes with DNA templates. The thermodynamic parameters of the formation of perfect and imperfect DNA complexes between native probes and their modified analogs were evaluated using the standard amplification with the real-time signal detection algorithm (вариант: with the function of the real-time signal detection). The values of the limit selectivity of the probe hybridization were calculated upon discrimination of the purine / purine mismatch A / A. The LNA-containing probes were proved to have the enhanced hybridization selectivity as compared to native ones (by factors of 1.4 to 5.9 at 65 °C). Modified probes containing the LNA unit just opposite the nucleotide substitution in an analyzed DNA were shown to discriminate a single nucleotide mismatch with a maximum extent.

Keywords: oligonucleotides, mismatch, LNA, selectivity of hybridization, fluorometric analysis, thermodynamics of complex formation.